

⑫ Int.Cl.

C 07 K 15/14
A 61 K 31/725

識別記号

ABL
ABY

庁内整理番号

8318-4H

⑬ 公開 昭和63年(1988)5月24日

7252-4C ※審査請求 未請求 発明の数 5 (全13頁)

⑭ 発明の名称 硫酸化多糖体DS4152並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

⑮ 特 願 昭62-125443

⑯ 出 願 昭62(1987)5月22日

優先権主張 ⑰ 昭61(1986)5月23日 ⑱ 日本(JP) ⑲ 特願 昭61-118847

⑳ 発 明 者 井 上 和 弘 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉑ 発 明 者 田 中 紀 子 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉒ 発 明 者 是 永 博 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内

㉓ 出 願 人 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

㉔ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名
最終頁に続く

明 細 書

ガラクトース標準)

1. 発明の名称

蛋白含量(%): 1 ± 0.5 (ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

硫酸化多糖体DS 4152 並びにこれを含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤

2. 特許請求の範囲

(4) 比旋光度

1. ナトリウム塩として下記の物理化学的性質を有する硫酸化多糖体DS 4152。

$(\alpha)_D^{20} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯 1240, 840(肩), 810(cm^{-1} ; KBr)

(1) 分子量(ゲルろ過法による)

29000 ± 3000

(6) 溶解性

(2) 元素分析値

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 呈色反応

(3) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%): 57 ± 3 (フェノール-硫酸法、

フェノール-硫酸、アンスロン-硫酸、ビュレット反応およびローリー・フォリン反応

は陽性。水溶液のエルソン・モルガン反応およびニヒドリッソ反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3%濃度水溶液)

(9) 構成糖および硫酸基、燐の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、 SO_3Na およびP(燐)の含有モル比はD-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

(10) 構成アミノ酸およびアミノ糖

加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、シロアミノピメリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸の存在を認める。

水の範囲第5項記載の血管新生抑制剤。

8. 硫酸化多糖体DS 4152と、ステロイド剤とを有効成分として含有する抗腫瘍剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規な硫酸化多糖体DS 4152並びにこれを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤並びにこれと更にステロイド剤を含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤に関する。

(従来の技術及びその問題点)

従来、ミクロコフカス sp. AT-25の発酵生産物中に細胞誘導作用、感染防制作用およびインターフェロン誘起作用を有する硫酸化多糖体DF 4639が存在することが知られて

2. 硫酸化多糖体DS 4152を有効成分として含有する血管新生抑制剤。

3. リウマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾癬、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症に有効な特許請求の範囲第2項記載の血管新生抑制剤。

4. 硫酸化多糖体DS 4152を有効成分として含有する抗腫瘍剤。

5. 硫酸化多糖体DS 4152と、ステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

6. ステロイドが糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類から選ばれたものである特許請求の範囲第5項記載の血管新生抑制剤。

7. リウマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾癬、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症に有効な特許請

いた(特開昭56-67301号、特開昭57-42627号および特開昭59-25329号)。

本発明者らは、種々の有用性の期待される硫酸化多糖体DF 4639について生物学的特性を明らかにすべく検討をおこなった結果、DF 4639が強い発熱性を有することを知つた。

(問題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、この発熱性物質を除去すべく、更に研究をおこなつていたところ、DF 4639は、いくつかの成分の混合物であり、そのうちのDS 4152と名づけられた一成分は発熱性がなく、しかも優れた血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用を有することを見出した。

更にまた、本発明者は、この DS 4152 とステロイド剤とを組合せると血管新生抑制作用及び抗腫瘍作用が相乗的に増強されることを見出した。

本発明は、上記の知見に基くものであり、その目的は、新規な糖酸化多糖体 DS 4152 を提供するものである。

また、本発明の他の目的は、糖酸化多糖体 DS 4152 を有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

更に、本発明の他の目的は、糖酸化多糖体 DS 4152 とステロイド剤とを有効成分として含有する血管新生抑制剤及び抗腫瘍剤を提供するものである。

本明細書中の「血管新生抑制」とは、胚の

物工業技術研究所には、*Micrococcus* sp. AT-25 として、FERM P-5255 及び *Arthrobacter* sp. AT-25 として FERM BP-1357 の番号で寄託されている) の培養物から分離される DF 4639 (特開昭56-67301号参照) から、その中に含まれる分子量約 1.5×10^6 以上の発熱性物質等を適当な分子量分画法、例えばゲルろ過法や限外ろ過法、アルコール沈澱法で除くことによつて得られる。

すなわち、ゲルろ過法によれば DF 4639 を適当なゲルろ過担体、例えば、セファクリル (Sephacryl S-300 (ファルマシア製)) を用いてゲルろ過を行い、得られるフラクションについて高圧ゲルろ過クロマトグラフィ

発育、黄体形成、創傷の治癒等に極めて重要なだけでなく、関節リウマチを含む慢性炎症、免疫応答、腫瘍増殖等の病的状態に於いてもその病体の進展に深く関与している血管の新生作用を弱めることをいう。したがつて、血管新生抑制剤は、上記血管の新生作用が関与する諸疾患、例えばリウマチ性関節炎、増殖性網膜炎、乾癬、糖尿病性網膜炎、未熟児網膜症等の治療、予防に有用なものである。特に腫瘍は強い血管新生を促し、新生された血管より供給される血液がさらに腫瘍の増殖と進展を促進するとされているので、抗腫瘍剤としても有効である。

本発明の糖酸化多糖体 DS 4152 は、アルスロバクター sp. AT-25 (工業技術院微生物

一(東洋ソーダ製 G3000 SW カラム使用)を行い、排除限界(ボイド・ボリウム、void volume)にピークを示すフラクション(H面分)とボイド・ボリウムにピークを与えず分子量約 $2 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ の範囲に析出されるフラクション(L面分)を各々集め、透析する。

また、限外ろ過は適当な膜(例えば Amicon 社製の YM10、YM30、XM50、PM30 や Filtron 社製の NOVA100、OMEGA100、NOVA50、OMEGA50 等特に YM10)を用い、窒素ガスによる加圧またはペリスタリク(peristaltic)ポンプによつて加圧(0.5~5 kg/cm² 程度)し、透過液を DS 4152 として集めればよい。使用溶媒は、水-エタ

ノール (10:2~3) または水が適当であり、4℃乃至室温で行なうのが一般的である。

得られた各透析内液を濃縮後ろ過し、ろ液を数倍量のエタノール中に攪拌下注ぐことにより生成する白色沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥すれば、目的とするDS 4152 (L面分) と発熱性物質 (R面分) が各々得られる。

こうして得られるDS 4152 は以下に述べる物理化学的諸性質を示す。下記の物性はそのナトリウム塩についてのものである。

(1) 分子量 (ゲルろ過法による)

29,000±3,000

(2) 元素分析値 (シロットの巾を示す)

ルム、メタノール、エタノール等の有機溶媒には殆ど不溶。

(7) 呈色反応

フェノール-硫酸、アンスロソ-硫酸、ビュレット反応およびローリー・フォリン反応は陽性。水溶液のエルソン・モルガン反応およびニンヒドリン反応も陽性。カルバゾール反応および坂口反応は陰性。

(8) 塩基性、中性、酸性の区別

pH 6~8 (3%濃度水溶液)

(9) 構成糖および硫酸基、燐の含量

D-グルコース、D-ガラクトース、SO₃Na および P (燐) の含有モル比は D-グルコースを10としてそれぞれ約10:61:73:6である。

C 24.42~25.76% H 3.34~3.98%

N 0.51~0.89% S 1.06~1.17%

P 0.77~1.06%

(3) 糖および蛋白質の含量

糖含量(%) : 5.7±3 (フェノール-硫酸法、ガラクトース標準)

蛋白含量(%) : 1±0.5 (ローリー・フォリン法、牛血清アルブミン標準)

(4) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} -37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ (0.5%水溶液)

(5) 赤外線吸収スペクトルにおける主要吸収帯

1240, 840 (肩), 810 (cm⁻¹; KBr)

(6) 溶解性

水に易溶。エーテル、ベンゼン、クロロホルム

(10) 構成アミノ酸およびアミノ糖

酸加水分解物のアミノ酸分析計による分析で、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ジアミノピメリン酸、グルコサミンおよびムツミン酸の存在を認める。

以上のDS 4152 は、後記実施例で示す如く、単独でも血管新生抑制作用を有するものであるが、ステロイド剤と組合せることにより、更に優れた血管新生抑制作用を示す。

尚、本発明の血管新生抑制剤においては、DS 4152 の代りにヘパリン、低分子ヘパリン等を使用することもできる。

従来、プレドニゾロン、6-α-メチルプレドニゾロン、デキサメサゾン等のステロイドホルモンが、鶏胚尿膜、兎角膜、ハムスタ

一類炭に実験的に誘導された血管新生を抑制する作用を有することが報告されている

(Cancer Res. 39 1305 (1979) J. Natl. Cancer Inst. 57 769 (1976) 及び Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 1176 (1981))。

また、ステロイドホルモンのうち、糖質コルチコイド(プレドニゾロン、プレドニゾン、ベタメサゾン等)は白血病、悪性リンパ腫、乳癌、前立腺癌の治療に使用されている。

更に、アンドロステタンを母核とする男性ホルモンであるテストステロンプロピオネート、フルオキシメステロン等が抗乳癌薬剤として用いられており、20~30%の有効率が得られると報告されている(Oncologia 10 72 (1984))。

ゾロンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、フォスフェート、ブチルアセテート、テトラヒドロフタレート、トリメチルアセテート等);メチルプレドニゾロンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート等);ベタメサゾンおよびその誘導体(フォスフェート、バレレート等)が挙げられる。

また、グルココルチコイドのC-11位の水酸基が α 配置になつた異性体(たとえば、 11α -エピハイドロコルチゾン)も含まれるし、前記グルココルチコイドのテトラヒドロ代謝物(グルココルチコイド活性の有無は関連しない)も含まれる。

更に、黄体ホルモンであるプロゲステロン、

更にまた、プロゲステロンの誘導体、テストステロンの誘導体およびエストロジニン剤が前立腺癌の治療に用いられている。

前記のDS 4152 と組合せ用いることのできるステロイド剤は、糖質コルチコイド類、黄体ホルモン類、エストラン類及びアンドロスタン類等であり、より具体的には次のものが例示される。

- (1) プレグナンを母核とするステロイドホルモン、すなわちグルココルチコイドであり、たとえばコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、エナンテート、ウンデシレート等);ハイドロコルチゾンおよびその誘導体(アセテート、ヘキサクシネート、カプロエート等);プレドニゾンおよびその誘導体;プレドニ

メドロキシプロゲステロンおよびその誘導体(アセテート等)、デイドロゲストロンおよびその 17α -アセトキシ誘導体(デュフアストン)等があげられる。

更にまた、ミネラルコルチコイドであるアルドステロン、デソキシコルチコステロンおよびその誘導体(アセテート、トリメチルアセテート、エナンテート、フェニルプロピオネート等)もあげられる。

- (2) アンドロステタンを母核とするステロイドホルモン、すなわち、男性ホルモンであり、たとえば、アンドロステロン、テストステロンおよびその誘導体(プロピオネート、エナンテート、ブチレート、カプリレート等)があげられる。また、エピテオステノールおよび

その誘導体、ミピチオスタンがあげられる。
さらにフルオキシメステロンおよびその誘導体、メテルテストロンおよびその誘導体、スタノロンおよびその誘導体も含まれる。

- (3) エストランを母核とするステロイドホルモン、すなわち、卵胞ホルモンであり、たとえば、エストロンおよびその誘導体、エストラジオールおよびその誘導体（ベンゾエート、ジプロピオネート、バレレート、ウンデセノエート等）、エストリオールおよびその誘導体（トリプロピオネート等）があげられる。

本発明の血管新生抑制剤の剤型としては、有効成分を医学的に許容される担体、賦形剤を含有する種々の形態、例えば水または各種の輸液用製剤に溶解させた液剤、散剤、顆粒

である。注射による投与の場合は通常経口の1/5量が適当である。

また、本発明の血管新生抑制剤を抗腫瘍剤として用いる場合の投与方法及び用量も、ほぼ上記と同じである。

〔発明の効果〕

本発明のDS 4152はそれ単独であつても血管新生抑制作用を奏するが、これを更にステロイド剤と組合せるとより優れた血管新生抑制作用を奏する。

したがつて、DS 4152単独であつても血管新生抑制剤として有用であるが、更にステロイド剤と組合せたものは相乗的に作用が増強されるので、例えば腫瘍血管の新生を抑制し、癌の増殖を防ぐ血管新生抑制剤として等

剤、錠剤、注射剤、坐剤等が挙げられる。

本発明の血管新生抑制剤がDS 4152とステロイド剤とを含有するものである場合、これらをそれぞれ別個に上記剤型の単剤に調製して組合せ剤とすることも、あるいは両成分を含む合剤とし製剤化することもできる。

本発明の血管新生抑制剤は、静脈内、動脈内、経口、皮下、直腸内、粘膜内または患部局所内に投与することができる。その投与量は、成人の経口一日量で、DS 4152として1~2000mg程度であり、ステロイド類は男性ホルモン剤、糖質コルチコイド剤で10~1000mg、通常30~60mgが適当で、漸減していくのが好ましいことがある。プロゲステロン剤では100~1200mgが適当

に有用なものである。

〔実施例〕

次に実施例を挙げ、本発明を更に詳しく説明する。

実施例1(A)

特開昭56-67301号に記載の方法により得られたDF 4639 (50%)を15mlの0.1M NaClに溶解し、これを0.1M NaClで平衡化したカラム（セファクリルS-300；50×80cm）にかけて同溶媒にて溶出し、18mlずつ溶出液を換えた。得られたフラクションについて高速ゲル透過クロマトグラフィー（東洋ソーダ製G3000SWカラム、溶媒0.1M酢酸カリウム緩衝液pH6.5）を行い、ポイド・ボリュームにピークを与えず、

分子量(デkastラン標準)が約 2×10^4 ~ 8×10^4 の範囲に溶出されるフラクションを集め(約700ml)、脱イオン水に対して透析した。透析内液を約50mlまで濃縮後ろ過した。ろ液を約400mlのエタノール中へ攪拌下滴下して、生成した沈殿を集め、これを90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(50℃、6時間)して目的物のDS 4152の白色粉末3.8gを得た。

一方、上記高速ゲル透過クロマトグラフィーでボイド・ボリュームにピークを与えるフラクションを集め(約90ml)、上述のDS 4152の場合と同様に処理して、H面分を黄色粉末として0.18g得た。

(b) ガラクトース、グルコース、硫酸基および糖の構成モル比

検体を1規定硫酸中100℃で5時間加水分解しイオン交換樹脂で脱塩処理した後、常法によりアルジトールアセナートとしてガスクロマトグラフィーで分析した。また、硫酸基および糖のモル比は、SおよびPの含量(%)から算出した。

第2表

	ガラクトース	グルコース	硫酸基	糖
DS 4152	6.1	1.0	7.3	0.6
DF 4639	6.2	1.0	7.3	0.6
H面分	6.2	1.0	6.9	0.6

第2表は、グルコースを1.0モルとした場

DS 4152の物理化学的性質および生物学的性質をDF 4639およびそのH面分と比較して示す。

(a) 糖、蛋白、SおよびP含量(第1表)

第1表

	1) 糖(%)	2) S(%)	3) 蛋白(%)	4) P(%)
DS 4152	5.6	11.1	1.1	0.88
DF 4639	5.4	10.8	1.3	0.86
H面分	4.2	7.9	7.6	0.72

1) フェノール-硫酸法(ガラクトース換算)

2) アントノボラスの方法(C.A. Antonopoulos, Acta Chem. Scand. 16, 1521 (1962))による

3) ローリー・フォリン法(牛血清アルブミン換算)

4) チエンらの方法(P.S. Chen et al., Anal. Chem. 28, 1756 (1956))による。

合の各成分のモル比の1例である。

(c) 構成アミノ酸およびアミノ糖の同定

DS 4152を3規定塩酸中、100℃16時間加水分解した後、常法によりアミノ酸分析計にて分析した結果、アラニン、グリシン、グルタミン酸、ジアミノピメリン酸、グルコサミンおよびムラミン酸のピークを認めた。

(d) 比旋光度: $(\alpha)_D^{25}$ (c=0.5, 水)

第3表

	比旋光度
DS 4152	-37
DF 4639	-36
H面分	-34

(e) ゲルろ過層出パターン

第1図、第2図および第3図に、それぞれ

DS 4152、DP 4639 および E 面分の高速ゲル透過クロマトグラムを示す(東洋ソーダ製 G3000 SW カラム使用、溶媒 0.1 M 酢酸カリウム緩衝液 pH 6.5、0.9 ml/分、標準物質デキストラン T-10 および T-40)。

(i) 紫外線吸収スペクトル

2 mg/ml 水溶液において 220~340 nm に極大吸収は認められない。

(ii) 赤外線吸収スペクトル (KBr 錠)

1240、840 (cm⁻¹) および 810 cm⁻¹ に、糖化多糖に特徴的な吸収を示す。

DS 4152 の構造としては、主として D-ガラクトースと D-グルコースから成る糖質部分にムラミン酸フォスフェートを介してペプチドグリカン部の結合した糖化多糖体で

あると推定される。

(b) 発熱性試験

日本薬局方(第10改正)に準じて行つた発熱性試験の結果を第4表に示す。

以下余白

第 4 表

試 体	用 量 $\mu\text{g}/10\text{ml}$ $\times 10$	体 温 上 昇 度 $^{\circ}\text{C}$				判 定
		個 別	計			
DS 4152	75	0.20	0.10	0.15	0.45	-
	375	0.20	0.50	0.20	0.90	-
	15	1.55	1.25	1.40	4.20	+
DF 4639	75	1.40	2.00	1.80	5.20	+
	15	1.90	1.40	2.20	5.50	+
	75	1.80	1.75	2.65	6.20	+
E 面分						

。+ (陽性)、- (陰性)

(i) DS 4152 の急性毒性(マウス、静注)は、LD₅₀が2000 mg/kg以上であつた。

実施例 1 (B)

DP 4639 (3.0 g) を 300 ml の水-エタノール(10:3) 溶液に溶解し、YM10 膜(41.8 cm²、アミコン社製)を用いて、真空で加圧(1.5 kg/cm²)下、室温で限外ろ過した。上記溶液を追加しながら透過液量が約3 Lとなるまで実施した。透過液の濃縮液(約50 ml)に100 mlの酢酸ナトリウムを加えて溶解した後、遠心分離により得られる上清を約500 mlのエタノール中へ攪拌下滴下した。生成した沈澱を集め、90%エタノール、エタノール、アセトンの順に洗った後、減圧乾燥(55℃、5時間)してDS 4152

の白色粉末33gを得た。

このものの物理化学的性質は、次に示す通り、蛋白、S及びPの含量を除き、実施例1(A)のDS 4152と同一であつた。

糖含量 58%

S含量 11.3%

蛋白含量 0.9%

P含量 0.92%

高速ゲル濾過クロマトグラムを第4図に示す(G3000 SWカラム、0.1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.5)、0.8ml/分)。

実施例2

鶏胚尿膜血管新生阻止試験(直接法)：

鶏胚を用い、タイラーとフオークマン

(Nature 297:307,(1982))の方法を一

べた。ステロイドとしては、酢酸コルチゾン
を0.5 μ g/鶏胚の量(血管新生に影響のない量)用いた。また、比較として、DF 4839
及びH面分についてもその活性を調べた。この結果を第5表に示す。

第5表

50%血管新生阻止量(ID₅₀値)

	DS 4152	DF 4839	H面分
ID ₅₀ 値 (μ g/鶏胚)	3	30	800

実施例4

実施例2と同様な方法で、各種ステロイドとDS 4152の併用によるID₅₀値の変化を検討した。この結果、種々のステロイドに10

部改良した以下の方法で行つた。

鶏(ノーリンクロス)の4~5日齢受精卵の尿膜に、生理食塩水で溶解したDS 4152又はヘパリンを添加し、37℃で培養した。

養物添加2日後に、尿膜血管の発達度を生理食塩水のみを添加した対照と比較し、プロビット法により、50%血管新生阻止量(ID₅₀値)を算出した。

この結果、本発明のDS 4152のID₅₀値は、160 μ gであつた。これに対し、ヘパリンは、100 μ gでも作用を示さなかつた。

実施例3

鶏胚尿膜血管新生阻止試験(直接法)：

実施例2と同様にして、ステロイドと

DS 4152を併用した場合の効果について調

べた。DS 4152を加えれば、それぞれの鶏胚尿膜血管新生阻止活性が16~100倍に増加することが明らかとなつた(第6表)。

第6表

ステロイド	ID ₅₀ 値(μ g/embryo)	
	単 独	DS 4152 (増加) と併用 (倍率)
コルチゾンアセテート	120	0.17 (7.1倍)
ハイドロコルチゾン	110	0.16 (6.9)
プレドニゾン	130	0.08 (16.3)
6 α -メチルプレドニゾン	115	0.03 (38.3)
ベタメサゾン	0.80	0.05 (16.0)
テトラヒドロS	100	0.01 (100.0)
プロゲステロン	102	0.49 (2.1)
メトキシプロゲステロンアセテート	112	0.42 (2.7)
17 β -エストラジオール	198	0.28 (7.0)
フルオキシメステロン	124	0.12 (10.3)
5 α -アンドロスタン	232	0.29 (8)

実施例5

血管新生阻止作用 (ex vivo 法) :

DS 4152 を生理食塩水に溶解し、ICR系雄マウスに皮下もしくは経口で投与し、6時間後に血液を採取した。0.313%クエン酸ナトリウムで凝固を阻止し、直接法と同様に5日齢受精卵巣尿膜に添加し、2日後に判定した。この結果を第7表に示す。

第7表

投与ルート	投与量 (mg/kg)	血管新生阻止率 (%)
経口	3	-5.9
	30	26.4
	300	62.7
皮下	3	1.6
	30	37.8
	300	66.1

第8表

投与ルート	DS 4152	DF 4639	H 面分
皮下	92.2%	83.3%	86.8%
経口	92.7%	88.8%	82.8%

DS 4152 および DF 4639 は経口、皮下いずれの経路によっても受精卵巣尿膜血管新生を抑制することが認められた。

実施例7

血管新生阻止作用 (ex vivo 法) :

ICR系雄マウスに、生理食塩水に溶解したDS 4152 を経口投与した。ステロイドは、DS 4152 と共にまたは単独で、生理食塩水に懸濁して経口または筋肉内投与した。

投与6時間後に採血し、0.313%クエン

この結果から明らかなように、用量依存的な血管新生抑制作用が認められた。

実施例6

血管新生阻止作用 (ex vivo 法) :

実施例5と同様にして、ステロイドとDS 4152 を併用した場合の効果について調べた。ステロイドとしては、酢酸コルチソンを5mg/kgの割合で用い、DS 4152 は30mg/kg又は300mg/kgとなるよう調整して加えた。また、比較としてDF 4639及びH面分を用いた。この結果を第8表に示す。なお、表中の数値は、生理食塩水を同量投与した対照マウスより採取した血液を添加した受精卵巣尿膜血管の発達度を100%とした時の阻止率である。

酸ナトリウムで凝固を阻止し、これを直接法と同様に5日齢受精卵巣尿膜に加え、2日後に血管新生に及ぼす効果を判定した。結果は、同量の生理食塩水のみを投与したマウスの、6時間経過後の血液を加えた場合の受精卵巣尿膜血管の発達度を対照とし、阻止百分率で示した。この結果は第9表の通りである。

以下余白

表 9

ステロイド 物質名(ルート)	投与量 (mg/kg)	DS 4152 投与量 (mg/kg; p.o.)	血管新生阻止率 (%)
コルチゾン/アセテート(p.o.)	5	0 30	7.7 75.1
テトラハイドロ8(p.o.)	1 5	0 30	-26 71.7
エピオステロノール(1.m.)	50 100	0 30	-17.9 80.7
		0 30	4.0 5.2
		0 30	18.4 23.4
		0 30	24.2 37.6

実施例 8

抗腫瘍試験:

C57BL/6雄マウスに同系の肺癌由来腹水腫瘍 M5076 を 1×10^6 個皮下接種し、5日目より DS 4152 を 30 mg/kg/日 1 回 6 回皮下投与したところ、著大な抗腫瘍効果と生存日数の有意な延長が認められた。すなわち第 10 表に示すように移植 21 日目の腫瘍平均重量は対照群の 37% (63% 抑制) であり、かつメデイアン生存日数が対照群より 33% 延長した。

・腫瘍平均重量は、腫瘍塊の長軸と短軸の長さを測定し、以下の式から求めた。

$$\text{腫瘍平均重量} = (\text{長軸}) \times (\text{短軸})^2 \times \frac{1}{2}$$

実施例 9

抗腫瘍試験:

ICR 系雄マウス (5 週齢) にザルコーマ 180 (S180) を 1×10^6 個皮下接種し、3日目より酢酸コルチゾンの生理食塩水懸濁液を 250 mg/kg/日 の割合で 3 日間、100 mg/kg/日 の割合で 1 日投与した。

DS 4152 は生理食塩水に溶解し、0.61 mlもしくは 0.1 ml/マウスとなる様 1 日 1 回皮下もしくは経口にて 4 日間投与した。移植 7 日目に屠殺して腫瘍重量を対照と比較したところ第 11 表に示す如く酢酸コルチゾンのみを投与した群では腫瘍重量は生理食塩水投与群と差がなかったが、さらに DS 4152 を投与することにより顕著な増殖阻止作用が得ら

表 10

腫瘍系	群	投与量 (mg/kg)	腫瘍重量 (T/C%) ^(a)	(b) 延長率 (ILS%)
M5076	対照群	0	230 ± 0.18 (100)	0
	DS 4152 投与群	30	149 ± 0.09 (37)	33

(a) 移植 21 日目の平均腫瘍重量 ± 標準誤差、() 内は平均重量の割合。

(b) (薬物投与群のメデイアン生存日数/対照群のメデイアン生存日数 - 1) × 100

れ、対照群の腫瘍重量の69~17.5%であつた。

第11表

処 理	腫瘍重量	
	平均値±標準誤差	T/C%
生理食塩水(p)	Q361±Q191	1000
生理食塩水(pp)	Q391±Q122	1000
酢酸コルチゾン	Q340±Q162	94.2
DS 4152 (Q61mg/mouse pp)	Q361±Q070	1000
DS 4152 (Q1mg/mouse pp)	Q261±Q077	72.3
DS 4152 (Q61mg/mouse pp) +酢酸コルチゾン	Q063±Q018	17.5*
DS 4152 (Q1mg/mouse pp) +酢酸コルチゾン	Q028±Q011	7.4*
DS 4152 (Q61mg/mouse pp)	Q322±Q071	82.4
DS 4152 (Q1mg/mouse pp)	Q355±Q115	90.8
DS 4152 (Q61mg/mouse pp) +酢酸コルチゾン	Q063±Q036	16.1**
DS 4152 (Q1mg/mouse pp) +酢酸コルチゾン	Q035±Q015	6.9**

*P<0.05, **P<0.01 スチューデントt-検定による

滅菌し注射剤とする。

実施例12

錠剤：

DS 4152 6mg、プレドニゾン20mg、乳糖50mg、トウモロコシデンプン155mg、カルボキシメチルセルロースカルシウム5mg、ヒドロキシプロピルセルロース3mg及びステアリン酸マグネシウム0.5mgを常法に従つて混合、打錠し、1錠とする。

4. 図面の簡単な説明

第1図ないし第4図は高速ゲル透過クロマトグラムである。

以 上

実施例10

顆粒剤：

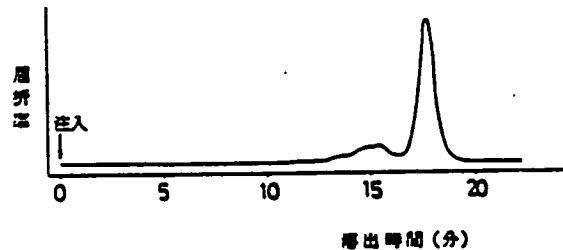
DS 4152 6mg、乳糖300mg、トウモロコシデンプン144mg、カルボキシメチルセルロースカルシウム30mg及びヒドロキシプロピルセルロース20mgを用い、常法に従つて500mgの顆粒剤を調製した。この顆粒剤は錠状にあわせて1日500mg~5gを服用する。

実施例11

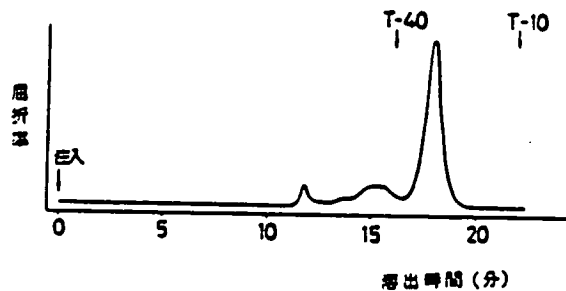
注射剤：

DS 4152 12mg、塩化ナトリウム90mgを注射用蒸留水に溶解し、10mlとする。この溶液をメンブランフィルターでろ過した後、アンプルに充填し、115℃で30分間

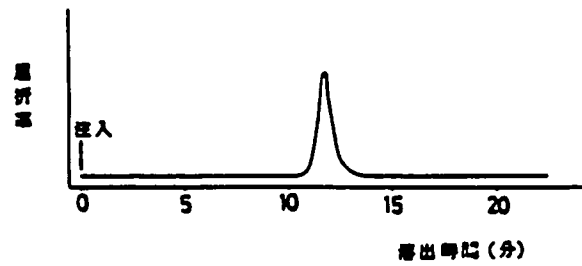
第1図



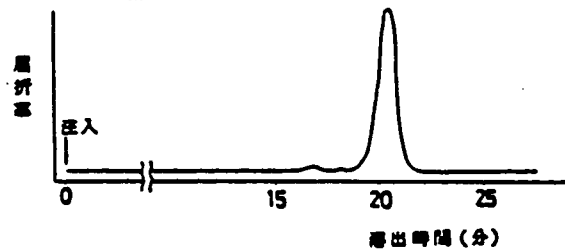
第2図



第3図



第4図



第1頁の続き

⑨Int.Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号
A 61 K 31/725	ADU	3615-4C
C 08 B 37/02	ABE	6779-4C
C 12 P 19/04		C-8515-4B
//(A 61 K 31/725-31:56)		7252-4C

⑦発明者 小河 秀正 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬中央研究所内